

## INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES DA ONCOPROTEÍNA E6 DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ-9 NO CÂNCER DE PULMÃO.

Rômulo Wamberto de Oliveira Silva<sup>1</sup>; Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: romulowos@gmail.com ,

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Histologia e Embriologia – CCS – UFPE. E-mail: jacintocosta@hotmail.com.

**Sumário:** O câncer de pulmão é o mais comum dentre os tumores malignos e o que mais leva a óbito. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), 27.330 novos casos estão previstos para o ano de 2014, sendo 16.400 em homens e 10.930 em mulheres. O INCA também afirma que a incidência mundial desse tipo de câncer aumenta 2% a cada ano e que a sobrevivência média em cinco anos varia entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento (INCA, 2014). Dentre os principais fatores de risco associado ao desenvolvimento da neoplasia pulmonar, os carcinógenos presentes na fumaça do tabaco são responsáveis por cerca de 80% dos casos, não se sabe qual a etiologia dos outros 15% a 25%. A investigação da(s) causa(s) do câncer de pulmão em não fumantes é de extrema importância para o desenvolvimento de terapias específicas, visto que o perfil molecular dos tumores em pacientes que nunca fumaram difere daquele de pacientes fumantes. Embora alguns estudos apontem o Papilomavírus Humano (HPV) como a segunda causa dessa doença (atrás do tabaco), a participação desse vírus no desenvolvimento desse tipo de câncer ainda é incerta. Estudos recentes mostraram, entretanto, que o HPV pode ter um papel relevante na etiologia e progressão do câncer de pulmão através da atividade das oncoproteínas E6 e E7. Além disso, entre os mecanismos carcinogênicos associados a esse tipo de câncer haveria uma relação entre as oncoproteínas do HPV e superexpressão das endopeptidases denominadas metaloproteinase de matriz (MMPs).

**Palavras-chave:** imunohistoquímica, metaloproteinases, neoplasia pulmonar, Papilomavírus Humano.

### INTRODUÇÃO

Aproximadamente 85% dos casos de câncer de pulmão são causados por carcinógenos presentes na fumaça do tabaco, enquanto os outros 15-25% dos casos ocorrem em pessoas que nunca fumaram (menos de 100 cigarros durante a vida) <sup>(1)</sup>. Uma meta-análise recente, de 27 estudos de corte transversal publicados entre 1989 e 2012, evidenciou grande variabilidade na prevalência do DNA do HPV nos cânceres de pulmão. Nas Américas Central e do Sul, a prevalência foi de 21,9%. Porém, na Ásia, na América do Norte e na Europa, foi de 4,6, 3,8 e 3,0%, respectivamente <sup>(2)</sup>. O Papilomavírus humano (HPV) consiste em um vírus não envelopado de dupla molécula de DNA circular com aproximadamente 8 Kb de pares de bases dividido em três regiões: região dos genes de expressão precoce (do inglês *E “early”*), região dos genes de expressão tardia (do inglês *“late”*) e a Longa Região de Controle (LCR). Dos genótipos de alto risco, o HPV16, HPV18, HPV31 e HPV33 estão associados com mais de 90% de todos os casos de lesões pré-cancerosas e lesões malignas da cérvix uterina <sup>(3,4)</sup>. Os primeiros estudos sugerindo uma relação entre infecção por HPV e cânceres de pulmão datam da década de 1980, quando foram descritas alterações epiteliais em carcinomas de brônquios que se assemelhavam àquelas causadas por HPV <sup>(5)</sup>. Desde então o DNA do HPV em câncer de pulmão foi detectado em várias partes do mundo: Ásia, América, Austrália e

Europa, com incidência média de 24,5%. Entretanto, os resultados desses estudos se mostraram altamente heterogêneos, com uma incidência global variando entre 0 e 78,3% dos casos analisados<sup>(6)</sup>.

Dentre os tipos de HPV mais prevalentes verificados em câncer de pulmão estão os tipos HPV 16, 18, 31, 33, 6 e 11<sup>(5,7)</sup>.

O provável mecanismo pelo qual o HPV promove a progressão de carcinomas de pulmão não é totalmente conhecido. Estudos recentes mostraram, entretanto, que a oncoproteína viral E6 do HPV-16 é capaz de promover angiogênese e metástases através do aumento da expressão de diversos fatores em células tumorais, entre eles HIF1- $\alpha$ , VEGF e IL-8<sup>(8)</sup>.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados para esse estudo pacientes com câncer de pulmão e outras tumores pulmonares do setor de pneumologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), num total de 52 pacientes.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) sob o CAAE no. 06396812.0.0000.5208, obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

As amostras foram obtidas através de material de arquivo utilizado na rotina de diagnóstico histopatológico, ou seja, blocos de parafina de biópsias cirúrgicas com porções representativas do tumor.

A extração do DNA foi feita através do kit de extração *GenominPrep Blood DNA isolation* (Amesha Bioscience), seguindo as instruções do fabricante.

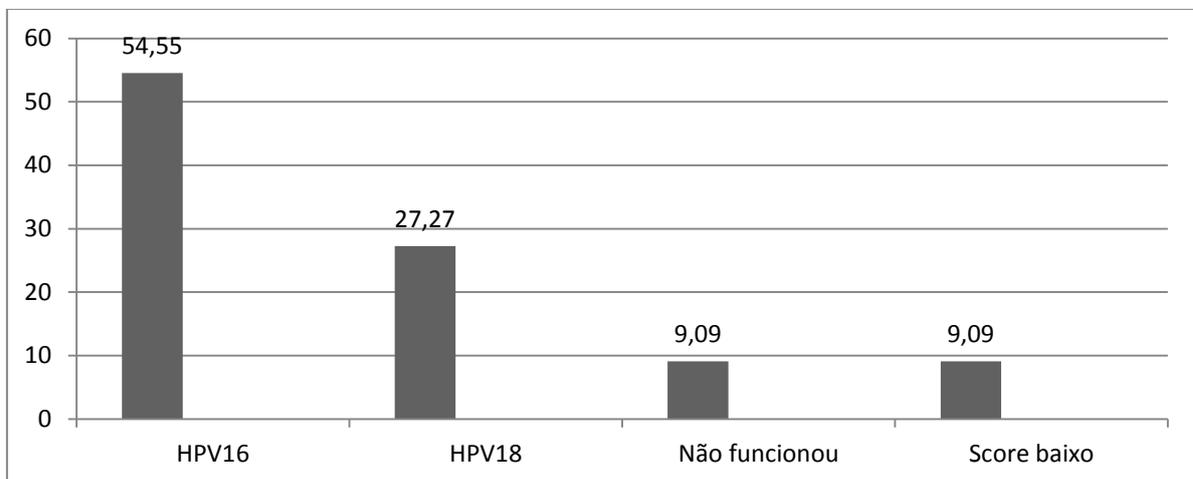
O DNA do HPV foi detectado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, com a utilização dos primers consenso e degenerados MY09/MY11, como descrito por Kay et al. (2002). Em seguida as amostras foram tipificadas através do sequenciamento utilizando primers para os HPV 6, 11, 16, 18, 31 e 33.

A imunohistoquímica para MMP-2 e da MMP-9 foi realizada em espécimes colhidas para biópsias e emblocadas em parafina, as quais foram utilizadas para o diagnóstico histopatológico, contendo representativas porções do tumor. Foram realizados cortes de 4 $\mu$ m de espessura em material parafinado. As amostras foram desparafinadas em xilol e reidratadas e, posteriormente foi realizada a recuperação antigênica a 100°C na panela de pressão elétrica. As lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente e a peroxidase endógena foi bloqueada por 30 minutos na solução bloqueadora de peroxidase. Após resfriadas, as lâminas foram incubadas por 2 horas a 37°C com anticorpo monoclonal contra a proteína MMP-2 (anti-MMP-2) na diluição de 1:400 (Ac: 3 microlitros, PBS-BSA – 1.197 microlitros), anti-MMP-9 também na diluição de 1:200 (Ac: 5 microlitros, PBS-BSA – 995 microlitros), e em seguida lavadas com tampão fosfato (PBS), posteriormente as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário (ADVANCE™ HRP LINK) por 20 minutos e novamente lavadas com tampão fosfato (PBS). Novamente as lâminas foram incubadas com anticorpo terciário (ADVANCE™ HRP ENZIME) por 20 minutos em temperatura ambiente e novamente lavadas com tampão fosfato PBS, logo em seguida, as lâminas foram incubadas com a solução cromógena de diaminobenzidina (DAB), lavadas em água, contra-coradas em hematoxilina Harris, desidratadas e montadas. A análise da reatividade foi feita através do núcleo e citoplasma das células epiteliais, utilizando-se a caracterização de “reativo” e “não-reativo”, foi avaliada também a localização (citoplasma e/ou núcleo), bem como a intensidade (método semi-quantitativo- +, ++, +++).

## RESULTADOS

Os seguintes tipos de tumores encontrados durante a análise histológica de 52 amostras de pulmão foram: 16 amostras (30,8%) de adenocarcinoma (Ad.), 4 (7,7%) carcinoma de células grandes (Ca.CG), 7 (13,5%) carcinoma de células pequenas (Ca.CP), e 17 amostras (32,7%) carcinoma escamoso (Ca.E), os subtipos, carcinoma escamoso mal-diferenciado (Ca.EMD), carcinoma de células pequenas não indiferenciado (Ca.CNPI) e metástase (Me.), apresentaram 1 amostra (1,9%) cada. Uma pequena porcentagem dessas amostras não foi identificada quanto ao tipo de tumor (NI), essas amostras não apresentaram áreas significativas do tumor.

Entre as 52 amostras analisadas, 46 foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com a utilização dos primers consenso e degenerados MY09/MY11 a fim de se verificar a presença de DNA viral. Dessas 46 amostras, 76,09% não apresentaram DNA de HPV, enquanto 23,91% apresentaram DNA do vírus. Em seguida, as 11 amostras que apresentaram DNA viral foram submetidas a sequenciamento para identificação dos tipos virais presentes. Os tipos de HPV encontrados foram os HPV-16 (6 amostras, 54,55%) e HPV-18 (3 amostras, 27,27%).



- Gráfico 02: Porcentagem dos tipos de HPV encontrados nas 11 amostras sequenciadas.

Posteriormente doze amostras foram submetidas à imunohistoquímica (IHQ) para avaliação da expressão das metaloproteínas de matriz-2 (MMP-2) e -9 (MMP-9). Elegeram-se a imunohistoquímica, como método de investigação, pela facilidade da utilização dos tecidos emblocados em parafina, o que facilita a obtenção da amostra. As amostras submetidas à imunohistoquímica foram selecionadas devido à disponibilidade de material histológico e foram excluídas as amostras que não foram identificadas quanto ao subtipo histológico de tumor.

Das 12 amostras, 18,18% foram classificadas como não-reativas (não houve expressão), 18,18% apresentaram o núcleo reativo para a MMP-2(+) e 45,45% citoplasma reativo também para a MMP-2(++). Foi detectada uma pequena expressão citoplasmática (+/-) e (+) de MMP-9 em 18,18% das amostras, percentual correspondente às duas amostras de adenocarcinoma.

## DISCUSSÃO

Estudos realizados na Itália e Reino Unido obtiveram 0% na prevalência de DNA de HPV em cânceres de pulmão (KOSHIOL J, et al. 2010; GALVAN A, et al. 2012). Todavia, os realizados nas Américas do Norte, do Sul e Central; Ásia, apresentaram variações entre 4,6% a 21,9% biopsias de pulmão<sup>(2)</sup>.

O presente estudo avaliou 52 amostras de câncer de pulmão sendo 23,9% portadoras de DNA de HPV, se aproximando da prevalência encontrada em outras pesquisas realizadas anteriormente nas regiões das Américas do Norte, Sul e Central.

A grande variabilidade na prevalência do DNA do HPV nos tipos de câncer estudados poderia ser explicada pelas diferenças na localização geográfica, pequeno número de casos incluídos nos artigos originais, comportamento sexual dos participantes, predisposição genética, tipo tumoral, além da possibilidade de contaminação<sup>(9)</sup>.

Os tipos de HPV encontrados através do sequenciamento foram os HPV de alto-risco 16 e 18. Estudos também evidenciaram que os tipos mais frequentes de HPV em cânceres não-anogenitais são os -16 e 18<sup>(2, 10-13)</sup>.

Das 12 amostras submetidas à imunohistoquímica, 18,18% foram classificados como não-reativas (não houve expressão), 18,18% apresentaram o núcleo reativo para a MMP-2(+) e 45,45% citoplasma reativo também para a MMP-2(++). Foi detectada uma pequena expressão citoplasmática (+/-) e (+) de MMP-9 em 18,18% das amostras, percentual correspondente às duas amostras de adenocarcinoma.

Conforme os estudos apontam, o padrão tissular de expressão imunohistoquímica de MMP varia com a função do seu substrato, tipo de câncer e perfil clínico do paciente<sup>(14)</sup>, sendo compreensível a variação encontrada no presente trabalho.

Os achados da imunohistoquímica (IHQ) evidenciam a presença das metaloproteinases de matriz-2 e -9 nas lesões pulmonares e da oncoproteína E6 do HPV-16 e 18. Entretanto, ainda não foi possível estabelecer uma correlação estatística. O atual projeto teve dificuldade com a aquisição de amostras e, conseqüentemente com o fechamento da sua casuística.

## CONCLUSÕES

A associação entre o uso de tabaco e a carcinogênese atribuída ao HPV não pôde ser comprovada devido ao número restrito de amostras, mas em trabalhos futuros uma investigação com um número maior de casos poderia elucidar esse ponto.

Os achados da imunohistoquímica (IHQ) evidenciaram a presença das metaloproteinases -2 e -9 nas lesões pulmonares, entretanto, uma associação estatisticamente válida com a oncoproteína E6 do HPV não possível ser estabelecida.

A literatura tem demonstrado que pacientes com neoplasias positivas para o DNA do HPV em pulmão, detectados pela técnica de PCR apresentam desfechos distintos quando comparados com aqueles os casos negativos para o vírus, os quais apresentam resultados mais favoráveis, com uma maior taxa de sobrevida. Esses argumentos corroboram com incentivos a futuras pesquisas de caracterização de perfil clínico de pacientes com neoplasias pulmonares-HPV-positivos, visando constatar se há diferença significativa quando comparados com pacientes negativos para o HPV em portadores de cânceres de pulmão, visando o desenvolvimento de terapias dirigidas.

Portanto, investir em estudos mais amplos com grupos de neoplasia pulmonares HPV-positivos e utilizando para isso mensuração das oncoproteínas virais E6 e E7 e das metaloproteinases de matrix-2 e -9 ,poderá fornecer maiores esclarecimentos sobre o desfecho clínico e terapêutico, bem como na formação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco pelo incentivo através da bolsa de iniciação científica(PIBIC/CNPq). Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares(LPCM), principalmente ao meu orientador Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto<sup>2</sup> e a minha co-orientadora Dafne Carolina Alves Quixabeira..

## REFERÊNCIAS

- 1- Larsen J. E.; Minna J. D. 2011. Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Clin Chest Med.* December; 32(4): 703–740.
- 2- Regin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, Chen Z, Flores-Obando R, Gibbs D, et al. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis.*2014;35(6):1267-75.
- 3- zur Hausen. Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies To Clinical Application. *Nature.* v.2, p.342-350. May. 2014.
- 4- Clifford, G.M.; Rana, R.K.; Franceschi, S.; Smith, J.S.; Gough, G.; Pimenta, J.M. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: Comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention.* v.14(5).p.1157–1164. 2005.
- 5- Sirjanen, K. J.; Sirjanen, S.; Kellokoski, J.; Kärjä, J.; Mäntyjärvi, R. 1979. Human papillomavirus (HPV) type 6 and 16 DNA sequences in bronchial squamous cell carcinomas demonstrated by in situ DNA hybridization. *167:33-42.*
- 6- Srinivasan et al., 2009
- 7- Klein et al., 2009
- 8- Shiau M. Y.; Fan L. C.; Yang S. C.; Tsao C. H.; Lee H. ; et al. 2013. Human Papillomavirus Up-Regulates MMP-2 and MMP-9 Expression and Activity by Inducing Interleukin-8 in Lung Adenocarcinomas. *PLoS ONE* 8(1): e54423. doi:10.1371/journal.pone.0054423.
- 9- Gomes, O.V. et al. Prevalência da infecção pelo HPV em cânceres não anogenitais: uma revisão sistemática, *FEMINA* Novembro/Dezembro 2014, vol 42, nº6.
- 10- Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, ELuf-Neto J, et al. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol.* 2011;40(2):489-502.
- 11- Evans M, Newcombe R, Fiander A, Powell J, Rolles M, Thavaraj S, et al. Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: an observational study of diagnosis, prevalence and prognosis in a UK population. *BMC cancer.* 2013;13:220.
- 12- Herrera-Goepfert R, Lizano M, Akiba S, Carrilo-Garcia A, Becker-D'Acosta M. Human papilloma virus and esophageal carcinoma in a Latin-American region. *World J Gastroenterol.* 2009;15(25):3142-7.
- 13- Sigaroodi A, Nadji SA, Naghshvar F, Nategh R, Emami H, Velayati AA. Human papillomavirus is associated with breast cancer in the north part of Iran. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:837191.
- 14- De Clerck YA. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer.* 2000; 36(10): 1258-68.